

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

World Patents data comes from the World Patents Index database which is prepared 1997 by Derwent Information, Ltd., London, U.K. and made available by Knight-Ridder Information, Inc.

Record 1

008044531 WPI Acc No: 89-309643/42

XRAM Acc No: C89-137095

XRPX Acc No: N89-235924

Freeze-dried antibody with human beta-interferon - stabilised with trehalose, retains activity for long period on storage, used in enzyme immunoassay kit

Index Terms: FREEZE DRY ANTIBODY HUMAN BETA INTERFERON; STABILISED

TREHALOSE RETAIN ACTIVE LONG PERIOD STORAGE ENZYME IMMUNOASSAY KIT

Patent Assignee: (TORA ) TORAY IND INC

Author (Inventor): OGAWA E; YAMAZAKI S; MATSUO E

Number of Patents: 006

Number of Countries: 013

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Week	Applic No	Date	LA	Pages	IPC	
WO 8909402	A	891005	8942	WO 89JP329	890329	Jap	24		(B)
EP 365685	A	900502	9018	EP 89904216	890329				
US 5262296	A	931116	9347	WO 89JP329	890329		7	G01N-033/53	
				US 445624	900104				
EP 365685	B1	950118	9507	EP 89904216	890329	Eng	8	G01N-033/535	
				WO 89JP329	890329				
EP 365685	A4	900926	9513	EP 89904216					
DE 68920693	E	950302	9514	DE 620693	890329			G01N-033/535	
				EP 89904216	890329				
				WO 89JP329	890329				

Priority Data (CC No Date): JP 8876881 (880330)

Applications (CC,No,Date): DE 620693 (890329); EP 89904216 (890329); WO 89JP329 (890329); WO 89JP329 (890329); EP 89904216 (890329); WO 89JP329 (890329); US 445624 (900104); EP 89904216 (890329); WO 89JP329 (890329); EP 89904216 ( )

Language: English; Japanese

EP and/or WO Cited Patents: JP 59144796; JP 60149972; JP 62206447; EP 111216 A; EP 140489 A; WO 8201773 A; WO 8700196 A; 01Jnl.Ref

Designated States

(National): JP; US

(Regional): AT; BE; CH; DE; FR; GB; IT; LI; LU; NL; SE

Filing Details: DE68920693 Based on EP 365685; DE68920693 Based on WO 8909402; US5262296 Based on WO 8909402; EP0365685 Based on WO 8909402

Abstract (Basic): WO 8909402

Freeze-dried compsn. contg. enzyme-labelled antibody to human beta-interferon is stabilised by addn. of trehalose (a non-reducing disaccharide) in the absence of conventional phosphate buffer to the compsn. before freeze-drying. The antibody may be polyclonal or monoclonal, esp. mouse antibody e.g. Fab' labelled with horse-radish peroxidase. Also claimed is a kit for enzyme immunoassay of human beta-interferon comprising: (a) a first antibody to human beta-interferon (pref. polyclonal) bound to a support; (b) a second, enzyme-labelled antibody to human beta-interferon, freeze-dried and stabilised with trehalose.

USE/ADVANTAGE - Stabilised, freeze-dried antibody compsn. retains high activity for a long period on storage, so is esp. suitable for use in an enzyme immunoassay kit, e.g. in diagnosis of hepatitis or T-cell leukaemia. @ (24pp Dwg.No.0/2)@

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Abstract (US): 9347 US 5262296 A

Enzyme immunoanalytical reagent comprises a freeze-dried compsn. contg. an enzyme-labelled anti-human beta-interferone antibody (pref. an Fab' fragment and/or labelled monoclonal antibody), opt. immobilised on a solid carrier (e.g. polyvinylpyrrolidone), and trehalose.

Pref. enzyme marker comprises horseradish peroxidase.

USE - The prods. retain their enzymic activity for long periods (e.g. 100% after 500 days at 4 C, and not less than 70% after 30 days at about 20C), and are stabilised immunoanalytical reagents for the determination of human beta-interferone levels. Dwg.0/2

Abstract (EP): 9507 EP 365685 B

A freeze-dried composition comprising a horseradish peroxidase-labelled Gab' fragment of an anti-human interferon-beta monoclonal antibody and trehalose, provided that the composition does not contain a non-volatile buffer. Dwg.0/2

File Segment: CPI; EPI

Derwent Class: B04; D16; S03; R16;

Int Pat Class: G01N-033/53; G01N-033/535; G01N-033/543; G01N-033/563;

G01N-033/569; G01N-033/574; G01N-033/576; G01N-033/577

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C2; B04-B04C5; B04-B04C6; B07-A02; B11-C07A4  
; B12-K04A1; B12-K04A4; D05-H06; D05-H09; D05-H10; D05-H11

Manual Codes (EPI/S-X): S03-E14H4

Chemical Fragment Codes (M1):

\*02\* M421 M750 M903 N102 Q233 V275

\*03\* M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V600 V611 V802 V811

\*05\* M421 M750 M903 N102 Q233 V275

Chemical Fragment Codes (M2):

\*01\* F012 F013 F014 F015 F016 F019 F123 F199 H4 H405 H424 H482 H5 H521

H8 K0 L8 L814 L819 L822 L831 M1 M126 M141 M280 M311 M322 M342 M373 M392

M413 M430 M510 M522 M530 M540 M782 M903 M904 N102 P831 Q233 Q620

R06064-D R06064-M

Chemical Fragment Codes (M6):

\*04\* M903 P210 P632 P721 P831 Q233 Q620 R514 R621 R624 R630 R637

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 <sup>4</sup> G01N 33/53, 33/535, 33/577	A1	(11) 国際公開番号 WO 89/09402  (43) 国際公開日 1989年10月5日 (05.10.89)
(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00329 (22) 国際出願日 1989年3月29日 (29. 03. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭63-76881 (32) 優先日 1988年3月30日 (30. 03. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP] 〒103 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松尾悦子 (MATSUO, Etsuko) [JP/JP] 〒210 神奈川県川崎市川崎区中瀬2-7-19 Kanagawa, (JP) 山崎品次郎 (YAMAZAKI, Shojiro) [JP/JP] 〒248 神奈川県鎌倉市津西2-4-17, F-2 Kanagawa, (JP) (74) 代理人 弁理士 川口義雄, 外 (KAWAGUCHI, Yoshio et al.) 〒160 東京都新宿区新宿1丁目1番14号 山田ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 AT (欧州特許), BE (欧州特許), CH (欧州特許), DE (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), IT (欧州特許), JP, LU (欧州特許), NL (欧州特許), SE (欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書		

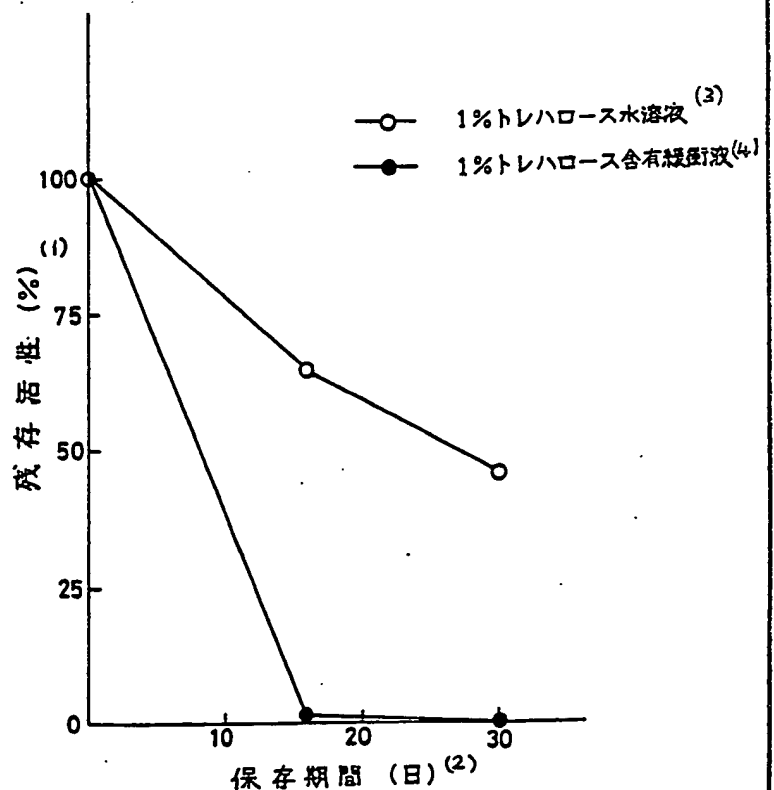
(54) Title: FREEZE-DRIED COMPOSITION CONTAINING ENZYME-LABELED ANTIHUMAN INTERFERON- $\beta$  ANTIBODY AND ENZYMATIC IMMUNOASSAY KIT CONTAINING THE COMPOSITION

(54) 発明の名称 酵素標識された抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体含有凍結乾燥組成物 およびこれを含むエンザイム免疫アッセイ測定キット

- (1) Residual activity (%)  
 (2) Storage period (days)  
 (3) 1% aqueous solution of trehalose  
 (4) Buffer solution containing 1% trehalose

(57) Abstract

The present invention relates to the stabilization of enzyme-labeled antihuman interferon- $\beta$  antibodies for use in an enzymatic immunoassay of human interferon- $\beta$  and provides a freeze-dried composition containing an antihuman interferon- $\beta$  antibody enzyme-labeled in the presence of trehalose as a nonreducing disaccharide. The freeze-dried composition according to the present invention whose reduction in enzymatic activity remains minimized even when stored for a long period of time is conveniently incorporated into an EIA kit. No ordinary non-volatile buffer solution such as a phosphate buffer solution is added to the original freeze-dried liquid of the present invention.



(57) 要約

本発明は、ヒトインターフェロン-βの酵素免疫測定法に利用する酵素標識された抗ヒトインターフェロン-β抗体の安定化に関し、非還元性二糖の一種であるトレハロースの存在下に酵素標識した抗ヒトインターフェロン-β抗体を凍結乾燥した組成物を提供する。本発明の凍結乾燥組成物は、長期保存状態においても酵素活性低下が極めて少なく、EIA測定キットに有利に組み込まれる。本発明の凍結乾燥原液にリン酸緩衝液等の通常の非揮発性緩衝液は添加しない。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CN	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トゴ
DE	ドイツ	MC	モナコ	TM	トルクメニスタン



酵素標識された抗ヒトインターフェロン- $\beta$   
抗体含有凍結乾燥組成物およびこれを  
含む  
エンザイムイムノアッセイ測定キット

## 発明の背景

### 発明の技術分野

本発明は、ヒトインターフェロン- $\beta$ の免疫学的微量定量法に利用する酵素標識された抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体の安定化に関し、より詳しくは酵素標識された抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体を長期間に亘って安定化することができる凍結乾燥組成物に関する。更に、本発明は、このような凍結乾燥組成物を含むエンザイムイムノアッセイ測定キットにも関する。

### 従来技術

血清、尿その他生物材料などに含まれる微量物質（例えばタンパク質、ペプチドホルモン他）などを測定しようとする場合には、被測定物質の含有量が少ないために高感度で、かつ特異性の高い測定法が要求される。この目的を満たす測定法として知られるのが、抗原抗体反応を利用した免疫測定法である。

この免疫測定法には競合法と非競合法とがあり、前者では被測定物質である抗原もしくは抗体を含む測定試料液と予め標識

## - 2 -

化した既知濃度の被測定物質とを混合し、これに抗体もしくは抗原を加え抗原抗体結合物を形成させる。この結合に関与した被測定物質と標識化した被測定物質との比率を測定することによって、被測定物質の含有量を算出することができる。一方、サンドイッチ法で知られる後者では、まず第一抗体を固相化し、これに被測定物質である抗原を含む測定試料液を接触させて抗原を固相化した第一抗体に結合させ、固相を液相から分離する。ついで、固相上の第一抗体に結合した被測定物質である抗原に標識化した第二抗体を抗原抗体反応によって結合させ、結合した標識抗体量を測定すれば被測定物質である抗原の量を知ることができる。

この免疫測定法は用いる標識物質によって、放射性物質による標識ではラジオイムノアッセイ、酵素による標識ではエンザイムイムノアッセイなどと区別される。近年エンザイムイムノアッセイは十分な測定感度、簡単な操作性、やっかいな使用後の処理問題がないことなどにより、通常の臨床検査などに広く応用されつつある。ところが酵素で標識された抗体あるいは抗原は、凍結乾燥品としての長期安定性に問題があり、実用の妨げになっていることから長期保存状態においても酵素活性が低下することのない酵素標識抗体、あるいは酵素標識抗原を開発

することが望まれていた。一般に、酵素標識抗体としての酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体は、その調製直後の活性は室温でほぼ2日程で50%失活し、7日後に至っては殆どを失活する。

### 発明の要旨

本発明の目的は、エンザイムイムノアッセイ(EIA)に使われる酵素標識抗体、特に生体液中のヒトインターフェロン- $\beta$ のEIAによる微量定量に使われる酵素標識された抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体の安定化法を提供することである。

本発明の他の目的は、長期保存状態においても酵素活性低下の極めて少ない酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体の凍結乾燥組成物を得ることである。

本発明の更に別の目的は、長期間に亘り安定性を有する前記凍結乾燥組成物を組み入れたエンザイムイムノアッセイ、特に非競合EIA測定用のキットを提供することである。

その他の目的は、以下の記述において明らかにする。

上記目的およびその他の目的は、非還元性二糖の一種であるトレハロースの存在下に酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体を凍結乾燥すれば達成され得ることが本発明によって知見された。

したがって、本発明は、トレハロースと酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体とから実質的になる凍結乾燥組成物を提供する。

本発明の凍結乾燥組成物は、酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体の長期に亙る保存安定性に良好なる結果をもたらし、一般に室温で30日後にあってもその活性を70%以上保持することができ、4℃での保存では500日後でも100%保持することができる。

このような長期保存安定性に優れる凍結乾燥組成物はヒトインターフェロン- $\beta$ の免疫学的微量定量に有利に利用し得ることから、本発明ではこの凍結乾燥組成物を組み込んだエンザイムイムノアッセイ測定用キットをも提供する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、1%トレハロース水溶液あるいは1%トレハロースを含む緩衝液を凍結乾燥原液とする、酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体の凍結乾燥組成物の37℃における残存活性の経日変化を示す。

第2図は、標準ヒトインターフェロン- $\beta$ の希釈系列（各200  $\mu$ l）を本発明の凍結乾燥組成物を用いて測定したサンドイッチ法エンザイムイムノアッセイの検量線を示す。

### 好適実施態様の説明

本発明の測定対象物であるヒトインターフェロン- $\beta$ としては、ヒト正常二倍体細胞が産生する天然型ヒトインターフェロン- $\beta$ も、遺伝子組換え技術を用いてヒトインターフェロン- $\beta$ 構造遺伝子を組み込んだ大腸菌、酵母などの微生物またはハムスター、サルなどの動物細胞により産生される遺伝子組換え型ヒトインターフェロン- $\beta$ も含まれる。

ヒトインターフェロン- $\beta$ の微量を高感度かつ高精度に免疫学的に定量するには、酵素で標識すべき抗体すなわち抗インターフェロン- $\beta$ 抗体として抗原分子の特定の抗原決定基のみを特異的に認識するモノクローナル抗体の使用が好ましい。モノクローナル抗体は、例えば公知の細胞融合法（例えば、Roger H. Kennet, Thomas J. Mckearn, Kathleen B. Bechtol ら編 Monoclonal Antibodies-Hybridomas : A New Dimension in Biological Analysis-" Plenum Press, New York および London, 1980参照。）に従って取得されるモノクローナル抗体産生細胞に産生させることによって得られる。すなわち、ヒトインターフェロン- $\beta$ によって感作されたマウス、ラット等の脾細胞と無限の増殖能を有するミエローマ細胞とを融合させて、抗体産生能と増殖能とを併せ持ったマウス、ラット等のハイブリド-

マを取得し、ついでクローニングによって目的とするモノクローナル抗体産生細胞が得られる。感作するヒトインターフェロン- $\beta$ は天然型でも遺伝子組換え型でも良い。

モノクローナル抗体が、ハイブリドーマを腹水型として増殖して得られるマウス等の腹水由来である場合は、これをタンパク質濃度 5~500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度に適当に希釈して用いれば十分であるが、勿論腹水から免疫グロブリン分画を精製して用いることもできる。ハイブリドーマを *in vitro* で細胞培養してモノクローナル抗体を採取する場合は、腹水に比べてタンパク成分中のモノクローナル抗体の純度が低すぎる人が多いので、その場合は *in vitro* 培養上清から硫酸分別沈澱、プロテイン-A カラムあるいはヒトインターフェロン- $\beta$  をリガンドとしたアフィニティーカラム（抗原カラム）等を用いて免疫グロブリン分画として精製濃縮する必要がある。この場合はハイブリドーマの培養に使用される牛血清成分由来の牛の免疫グロブリンが混入することもあるが実用上それで十分である。最近、無血清培地が色々考案されているので（例えば、T. H. Changら、J. Immunol. Methods, 39 (1980), 369-375参照）、もしそのような培地で培養できるハイブリドーマであれば純度の高いモノクローナル抗体が得られるので便利である。本発明の抗ヒトイン

ターフェロン- $\beta$ モノクローナル抗体は好ましくは特開昭59-144796号公報記載のハイブリドーマ1H12株より得られるものが望ましい。特開昭59-144796号公報に記載の内容は、参照により本明細書中に含めるものとする。

更に、本発明のモノクローナル抗体は、免疫グロブリン分画にまで精製後、公知のペプシン処理法(Y. Hamaguchi ら(1979)、J. Biochem. 85, 1289-1300)に従ってFc部分を切除し、メルカプトエチルアミンにより還元開裂して得られるFab'部分を用いることが好ましい(S. Yoshitake ら(1979)、Scand. J. Immunol. 10, 81-86)。

上記した抗体を次いで酵素で標識するが、酵素標識抗体の調製には公知の試薬が使用できる。N-( $\epsilon$ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド、ビスマレイミド、グルタルアルデヒド、カルボジイミド等、二個の官能基を有する試薬があり、またペルオキシダーゼの糖類を過ヨウ素酸で酸化してアルデヒド基にする方法も有効である。これらの試薬を用い抗体の反応性を保った状態で常法に従って酵素を標識する。本発明で使用する酵素標識法として好ましくは、マレイミド導入ペルオキシダーゼと遊離型Cys残基をもつ抗体Fab'とを結合させる方法がよい。

本発明の凍結乾燥組成物は、通常 0.5～10% のトレハロース水溶液に 0.01～1  $\mu$ g の酵素標識抗体を混合し、これを凍結乾燥原液とし、常法に従って凍結乾燥することにより得られる。トレハロースは  $\alpha$ -D-グルコピラノシル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドで、生体中では細胞保護と関連して必然的に現われるといわれている二糖類である。

本発明の凍結乾燥組成物は、実質的にトレハロースと酵素標識抗体とのみから成り、保存安定性の妨げとなる物質は含まない。凍結乾燥原液にリン酸緩衝液等の通常の緩衝液を添加した場合は、凍結乾燥後に緩衝液由来の塩類等が残存し、これが保存安定性の妨げとなるため好ましくない。ただし、重炭酸アンモニウムのような揮発性の緩衝液は、凍結乾燥原液に添加しても、凍結乾燥後は保存安定性の妨げとならないため、添加しても構わない。

このようにして調製した本発明の酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$  抗体の凍結乾燥物は、その酵素活性が長期に亘り安定しており、ヒトインターフェロン- $\beta$  の微量定量用エンザイムイムノアッセイ測定キットに有利に利用することができる。

本発明の E I A 測定キットは、

(a) 固相担体に第一抗体である抗ヒトインターフェロン- $\beta$  抗



体を結合させてなる固相試薬、および

(b) 酵素標識された第二抗体である抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体とトレハロースとから実質的になる凍結乾燥組成物を含んでいる。

第一抗体としては、動物のヒトインターフェロン- $\beta$ 感作抗血清から得られるポリクローナル抗体を使用し得る。これは、マウス、モルモット、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、等の動物を常法によりヒトインターフェロン- $\beta$ を含む標品（純品である必要はない）で免疫して得たコンベンショナル抗血清を、好ましくは常法により免疫グロブリン分画として精製濃縮して用いる。

この精製したコンベンショナル抗体を、例えば96穴マイクロプレートに結合させ、牛血清アルブミン、カゼイン、ゼラチンあるいは市販のプロッキング剤などでブロックした後、ポリビニルピロリドンおよび蔗糖含有溶液で処理し、乾燥してマイクロプレートの固相試薬を得る。

第二抗体は、上に詳述した酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体であり、上に説明したようにトレハロースの存在下に凍結乾燥する。

本発明のEIA測定キットは、特に非競合的サンドイッチ法

に好都合に用いられる。

本発明の酵素標識抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体の凍結乾燥組成物を用いたサンドイッチ法の手順を以下に説明する。

(A) 被測定物質であるヒトインターフェロン- $\beta$ に対する第一抗体を担体上に固相化する。担体としてはサンドイッチ方式による免疫測定法において通常使用されるものであればいずれであっても用いることができる。たとえば、イムノアッセイ用プレートとして市販されているマイクロプレートやプラスチックビーズあるいはプラスチックをコートした鉄ビーズ等、ガラスビーズ、プラスチックチューブ、ペーパーディスク、架橋デキストラン粒子、架橋アガロース粒子等を例示することができる。これらの担体に第一抗体を固相化する方法としては、用いる担体に応じて物理的吸着や化学結合などの方法が適宜選択される。

(B) 固相化した第一抗体に測定試料を接触させ被測定物質であるヒトインターフェロン- $\beta$ を抗原抗体反応により第一抗体に結合させる。接触条件（温度、時間など）は適宜決定される。

(C) 次に、凍結乾燥した酵素標識第二抗体を緩衝液に溶解した後接触させ、抗原抗体反応により第二抗体を第一抗体に結合

## - 11 -

したヒトインターフェロン- $\beta$ に結合させる。これによってヒトインターフェロン- $\beta$ は第一抗体と第二抗体とにサンドイッチされる。接触条件（温度、時間など）は適宜決定される。

なお、(B)および(C)のステップを同時に行うワンステップ法も可能である。すなわち、測定試料と第二抗体とを同時に存在させることによって、ヒトインターフェロン- $\beta$ は第一抗体と第二抗体とにサンドイッチされ、しかもこのワンステップ法はより高感度の測定が期待できる。

標識は酵素で常法により行う。例えば酵素としてはアルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼのようなペルオキシダーゼ等が汎用される。

これらの実験手技は成書に詳しく解説されているので、目的に応じた標識抗体を調製する方法を知ることが容易である

（例えば、石川、河合、宮井ら編、“酵素免疫測定法”医学書院、1978、東京；B.B.Mishell 及び S.H.Shiigi ら編、

“Selected Methods in Cellular Immunology” W. H. Freeman and Comp: 1980 San Francisco；A. Kawamura 編、

“Fluorescent Antibody Techniques and their Applications” 第2版、Univ.Tokyo Press、1977、Tokyo 等参照）。

## - 1 2 -

(D) 第一抗体と第二抗体とにサンドイッチされたヒトインターフェロン- $\beta$ を第二抗体の量を測定することによって定量する。例えば、酵素で標識した第二抗体を用いた場合には、酵素基質を加えて酵素反応による基質の分解を比色測定する。既知濃度のヒトインターフェロン- $\beta$ を用いて検量線を作っておけば目的とする試料の濃度を知ることができる。

試料としては、培養液または体液、尿等の生体試料が挙げられる。また、ヒト血清あるいは血漿も用いられ、ヒト血中に内在するIFN- $\beta$ 測定も可能である。この内在性IFN- $\beta$ は、HIV、HB、HTLV-1および-2等の各種ウィルス感染患者血中において変動することが確認されており、従ってエイズ、肝炎、ATL等の診断薬として本発明の測定キットが期待される。

以下、非制限的实施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実 施 例

保存安定性の優れたヒトインターフェロン- $\beta$ エンザイムイムノアッセイ用酵素標識抗体凍結乾燥組成物：

特開昭62-206447号公報明細書に記載された方法に基づき、酵素標識抗体の調製並びにヒトインターフェロン- $\beta$ の測定を

行った。

a) 酵素標識抗体の調製：

特開昭59-144796号公報に示された抗ヒトインターフェロン-βマウスモノクローナル抗体に、抗体重量の4%に相当するペプシンを加え、37℃で20時間消化した後、Sephacryl S-200カラムによるゲル濾過にて抗体F(a b')<sub>2</sub>画分を得た。さらに、この画分をメルカプトエチルアミンにより還元処理を施し、Sephacryl S-200カラムによるゲル濾過にて抗体F a b'画分を得た。一方、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)にN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドを添加、30℃、60分間反応させた後、Sephadex G-25カラムにて分画し、マレイミド導入HRPを得た。さらに、このマレイミド導入HRP 1.2mgに上記調製した抗体F a b' 1.5mgを加え、4℃で20時間反応後、Ultrogel ACA-44カラムによるゲル濾過にて酵素標識抗体(HRP-抗体F a b')を得た。

b) ヒトインターフェロン-βの測定法：

抗ヒトインターフェロン-βウサギ抗血清よりアフィニティー精製したポリクローナル抗体をマイクロプレートに結合させた後、4%のポリビニルピロリドンおよび10%の蔗糖を

含有するPBS溶液で処理して乾燥させた。このプレートを洗浄液にて1回洗浄した後、ヒトインターフェロン含有サンプル 100 $\mu$ l、上記調製した酵素標識抗体（適宜希釈したもの）をwellあたり50 $\mu$ l加え、2～10℃で一晩反応させる。翌日プレート洗浄後、40mg o-フェニレンジアミン、20 $\mu$ l過酸化水素水を含むリン酸-クエン酸緩衝液（pH 5.0）から成る酵素基質液 100 $\mu$ l/well加え、室温暗所で60分間反応後、反応停止液（4.5規定硫酸） 100 $\mu$ l/well加えて反応を停止し、波長 490～405 nmにおける吸光度測定をする。

c) 本発明の凍結乾燥組成物の安定性：

上記測定法を用いて、以下の如く調製した酵素標識抗体凍結乾燥組成物の安定性を調べた。

a)で調製した酵素標識抗体 6 $\mu$ l（約 0.2 $\mu$ g）を10ml褐色バイアル瓶にとり、1%トレハロース水溶液、あるいは1%トレハロースを含む緩衝液（0.1Mリン酸緩衝液、pH 7.0） 1mlを加え、凍結乾燥により2種の凍結乾燥組成物を得た。ヒトインターフェロン- $\beta$ エンザイムイムノアッセイ時には測定用緩衝液（0.1Mリン酸緩衝液、0.1%牛血清アルブミン（BSA）、0.05% Tween-20、pH 7.0） 6mlにてバイアル中の凍結乾燥組成物を溶解し、その50 $\mu$ lを各wellに添加し、上記

## - 15 -

測定 b) に用いた。この 2 種類の酵素標識抗体凍結乾燥組成物を 37℃ にて 30 日間保存し、これらの保存安定性を比較した。なお、2 種の凍結乾燥組成物の凍結乾燥直後の残存活性には差はなかった。保存安定性の変化は凍結乾燥直後を 100% として残存活性で表わした。結果を第 1 図に示す。

第 1 図に示したように緩衝液を含む凍結乾燥組成物は 16 日、30 日と残存活性が極めて低く、トレハロースと酵素標識抗体とから実質的に成る凍結乾燥組成物の保存安定性に対する顕著な有効性を示した。

d) ヒトインターフェロン -  $\beta$  の定量：

本発明の酵素標識抗体凍結乾燥組成物を用いると、ヒトインターフェロン -  $\beta$  の高感度測定が可能となる。ヒトインターフェロン -  $\beta$  含有希釈系列サンプル（各 200  $\mu$ l）を使用し、上記 b) の測定法に従い測定した結果を第 2 図に示す。

第 2 図に示した検量線は、0.25 ~ 50 IU /  $\mu$ l まで直線を示し、測定限界は 0.25 IU /  $\mu$ l であった。バイオアッセイによる測定感度に比べると 20 倍以上高い。従って、本方法はヒト血中における内在性 IFN -  $\beta$  測定に有効で、病態と血中 IFN -  $\beta$  レベルとの関連にも重要な情報を得ることができる。

## 請 求 の 範 囲

1. 酵素標識された抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体とトレハロースとから実質的になる凍結乾燥組成物。

2. 抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第1項記載の凍結乾燥組成物。

3. 抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体がマウス抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体である請求の範囲第1項または第2項記載の凍結乾燥組成物。

4. 抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体がFab'画分である請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の凍結乾燥組成物。

5. 酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼである請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の凍結乾燥組成物。

6. 下記の(a)および(b)を含んでなるエンザイムイムノアッセイ測定キット：

(a) 固相担体に第一抗体である抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体を結合させてなる固相試薬、および

(b) 酵素標識された第二抗体である抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体とトレハロースとから実質的になる凍結乾燥組成物。



7. 固相試薬が、固相担体に第一抗体を結合させ、乾燥して得られたものである請求の範囲第6項記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

8. 固相試薬が、固相担体に第一抗体を結合させた後、ポリビニルピロリドンおよび蔗糖含有溶液で処理し、乾燥して得られたものである請求の範囲第6項または第7項記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

9. 第一抗体がポリクローナル抗体である請求の範囲第6～8項のいずれかに記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

10. 第一抗体がウサギ抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体である請求の範囲第6～9項のいずれかに記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

11. 第二抗体がモノクローナル抗体である請求の範囲第6～10項のいずれかに記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

12. 第二抗体がマウス抗ヒトインターフェロン- $\beta$ 抗体である請求の範囲第6～11項のいずれかに記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

13. 第二抗体がFab'画分である請求の範囲第6～12項のいずれかに記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

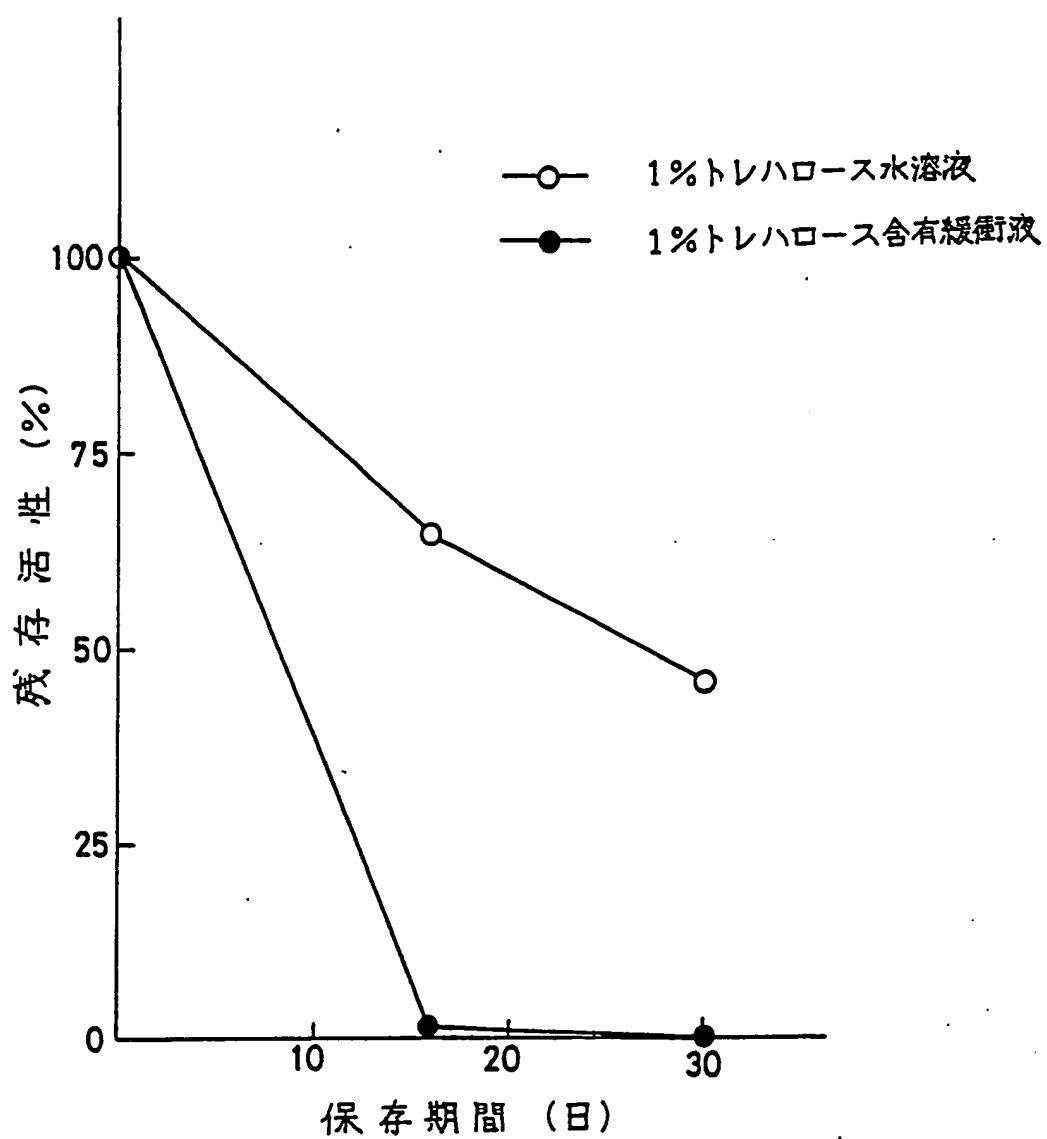
14. 第二抗体を標識する酵素が西洋ワサビペルオキシダーゼ

である請求の範囲第6～13項のいずれかに記載のエンザイムイムノアッセイ測定キット。

15. 請求の範囲第6項記載のエンザイムイムノアッセイ測定キットを含んでなるエイズ用診断薬。

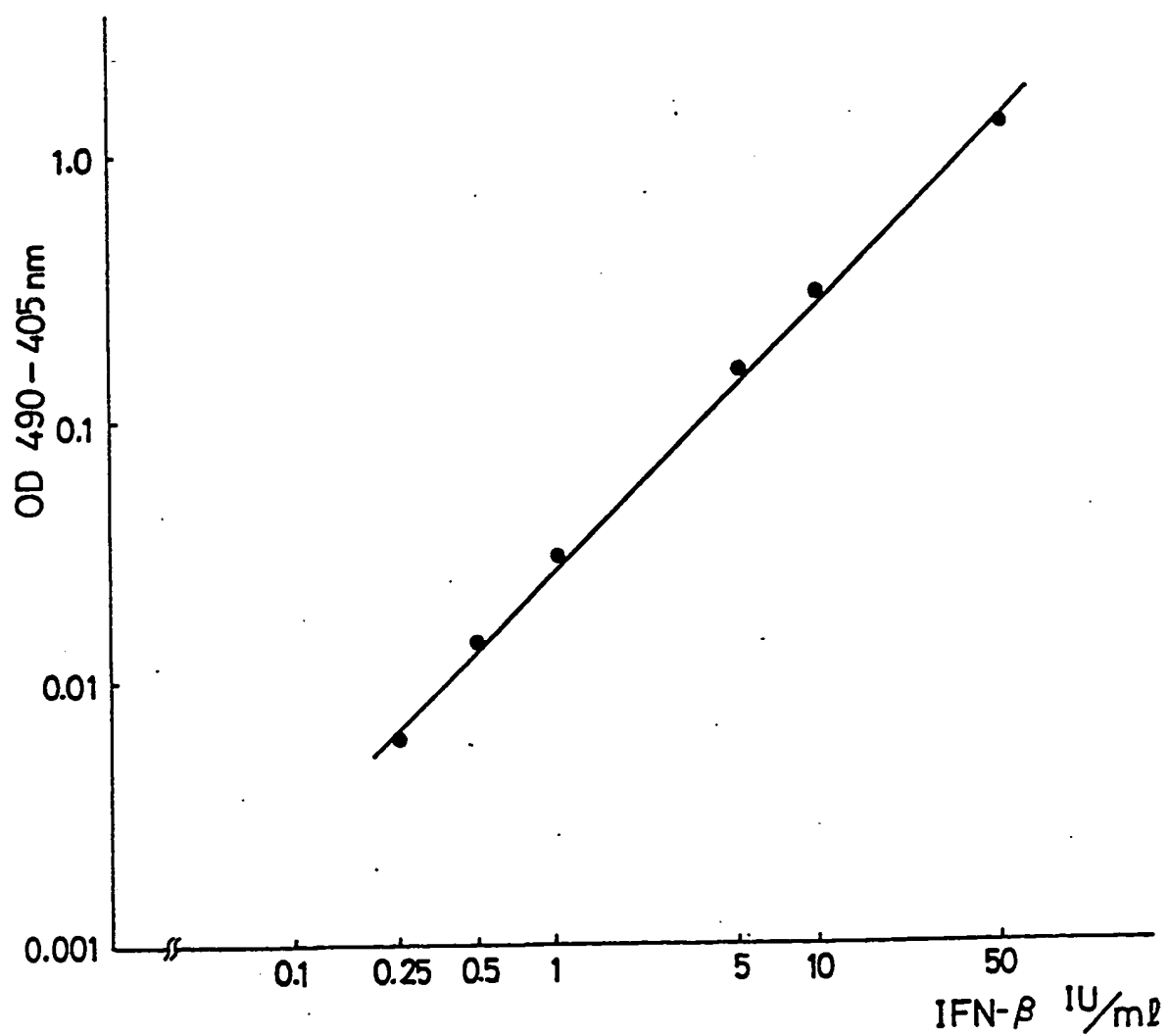
16. 請求の範囲第6項記載のエンザイムイムノアッセイ測定キットを含んでなる肝炎用診断薬。

17. 請求の範囲第6項記載のエンザイムイムノアッセイ測定キットを含んでなる成人T細胞白血病用診断薬。

$1/2$ 

第 1 図

2/2



第 2 図

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No **PCT/JP89/00329**

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) <sup>6</sup> According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>Int. Cl<sup>4</sup>    G01N33/53, G01N33/535, G01N33/577</b> </div>														
<b>II. FIELDS SEARCHED</b> <div style="text-align: center; padding: 5px;">             Minimum Documentation Searched <sup>7</sup> </div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%; border: none;">Classification System</td> <td style="border: none;">Classification Symbols</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>IPC            G01N33/53, G01N33/535, G01N33/577</b> </td> <td></td> </tr> </table> <div style="text-align: center; padding: 5px;">             Documentation Searched other than Minimum Documentation              to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched <sup>8</sup> </div> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; padding: 10px;"> <b>Jitsuyo Shinan Koho</b>  <b>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</b> </td> <td style="width: 50%; padding: 10px;"> <b>1971 - 1989</b>  <b>1971 - 1989</b> </td> </tr> </table>			Classification System	Classification Symbols	<b>IPC            G01N33/53, G01N33/535, G01N33/577</b>		<b>Jitsuyo Shinan Koho</b> <b>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</b>	<b>1971 - 1989</b> <b>1971 - 1989</b>						
Classification System	Classification Symbols													
<b>IPC            G01N33/53, G01N33/535, G01N33/577</b>														
<b>Jitsuyo Shinan Koho</b> <b>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</b>	<b>1971 - 1989</b> <b>1971 - 1989</b>													
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <sup>9</sup></b> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <th style="width: 10%; border: none;">Category <sup>10</sup></th> <th style="width: 70%; border: none;">Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup></th> <th style="width: 20%; border: none;">Relevant to Claim No. <sup>13</sup></th> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;"> <b>Y</b> </td> <td style="padding: 10px;"> <b>JP, A, 60-149972 (Yatoron Kabushiki Kaisha)</b>  <b>7 August 1985 (07. 08. 85)</b>  <b>(Family: none)</b> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;"> <b>1-17</b> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;"> <b>Y</b> </td> <td style="padding: 10px;"> <b>JP, A, 62-206447 (Toray Industries, Inc.)</b>  <b>10 September 1987 (10. 09. 87)</b>  <b>(Family: none)</b> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;"> <b>1-17</b> </td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;"> <b>A</b> </td> <td style="padding: 10px;"> <b>JP, A, 59-144796 (Yamasa Shoyu Co., Ltd.)</b>  <b>18 August 1984 (18. 08. 84)</b>  <b>(Family: none)</b> </td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;"> <b>1-17</b> </td> </tr> </table>			Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>	<b>Y</b>	<b>JP, A, 60-149972 (Yatoron Kabushiki Kaisha)</b> <b>7 August 1985 (07. 08. 85)</b> <b>(Family: none)</b>	<b>1-17</b>	<b>Y</b>	<b>JP, A, 62-206447 (Toray Industries, Inc.)</b> <b>10 September 1987 (10. 09. 87)</b> <b>(Family: none)</b>	<b>1-17</b>	<b>A</b>	<b>JP, A, 59-144796 (Yamasa Shoyu Co., Ltd.)</b> <b>18 August 1984 (18. 08. 84)</b> <b>(Family: none)</b>	<b>1-17</b>
Category <sup>10</sup>	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>												
<b>Y</b>	<b>JP, A, 60-149972 (Yatoron Kabushiki Kaisha)</b> <b>7 August 1985 (07. 08. 85)</b> <b>(Family: none)</b>	<b>1-17</b>												
<b>Y</b>	<b>JP, A, 62-206447 (Toray Industries, Inc.)</b> <b>10 September 1987 (10. 09. 87)</b> <b>(Family: none)</b>	<b>1-17</b>												
<b>A</b>	<b>JP, A, 59-144796 (Yamasa Shoyu Co., Ltd.)</b> <b>18 August 1984 (18. 08. 84)</b> <b>(Family: none)</b>	<b>1-17</b>												
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <sup>10</sup> Special categories of cited documents:  <b>"A"</b> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  <b>"E"</b> earlier document but published on or after the international filing date  <b>"L"</b> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  <b>"O"</b> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  <b>"P"</b> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed             </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top; padding: 5px;"> <b>"T"</b> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  <b>"X"</b> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step  <b>"Y"</b> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  <b>"Z"</b> document member of the same patent family             </td> </tr> </table>			<sup>10</sup> Special categories of cited documents: <b>"A"</b> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance <b>"E"</b> earlier document but published on or after the international filing date <b>"L"</b> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) <b>"O"</b> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means <b>"P"</b> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	<b>"T"</b> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention <b>"X"</b> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step <b>"Y"</b> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art <b>"Z"</b> document member of the same patent family										
<sup>10</sup> Special categories of cited documents: <b>"A"</b> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance <b>"E"</b> earlier document but published on or after the international filing date <b>"L"</b> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) <b>"O"</b> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means <b>"P"</b> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	<b>"T"</b> later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention <b>"X"</b> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step <b>"Y"</b> document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art <b>"Z"</b> document member of the same patent family													
<b>IV. CERTIFICATION</b> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none; padding: 5px;">                 Date of the Actual Completion of the International Search  <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>May 25, 1989 (25. 05. 89)</b> </div> </td> <td style="width: 50%; border: none; padding: 5px;">                 Date of Mailing of this International Search Report  <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>June 6, 1989 (05. 06. 89)</b> </div> </td> </tr> <tr> <td style="border: none; padding: 5px;">                 International Searching Authority  <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>Japanese Patent Office</b> </div> </td> <td style="border: none; padding: 5px;">                 Signature of Authorized Officer             </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>May 25, 1989 (25. 05. 89)</b> </div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>June 6, 1989 (05. 06. 89)</b> </div>	International Searching Authority <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>Japanese Patent Office</b> </div>	Signature of Authorized Officer								
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>May 25, 1989 (25. 05. 89)</b> </div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>June 6, 1989 (05. 06. 89)</b> </div>													
International Searching Authority <div style="text-align: center; padding: 10px;"> <b>Japanese Patent Office</b> </div>	Signature of Authorized Officer													

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>4</sup> G 0 1 N 3 3 / 5 3 . G 0 1 N 3 3 / 5 3 5 . G 0 1 N 3 3 / 5 7 7		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	G 0 1 N 3 3 / 5 3 . G 0 1 N 3 3 / 5 3 5 . G 0 1 N 3 3 / 5 7 7	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
日本国実用新案公報 1971-1989年 日本国公開実用新案公報 1971-1989年		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
Y	JP. A. 60-149972 (株式会社 ヤトロン) 7. 8月. 1985 (07. 08. 85) (ファミリーなし)	1-17
Y	JP. A. 62-206447 (東レ株式会社) 10. 9月. 1987 (10. 09. 87) (ファミリーなし)	1-17
A	JP. A. 59-144796 (ヤマサ醤油株式会社) 18. 8月. 1984 (18. 08. 84) (ファミリーなし)	1-17
<p>※引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>「&amp;」 同一パテントファミリーの文献</p>		
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 25. 05. 89	国際調査報告の発送日 05.06.89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 秋 月 美紀子	2 G 7 9 0 6